

30 11

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-340948

(43)Date of publication of application : 24.12.1993

---

(51)Int.Cl. G01N 33/547  
B01J 20/26  
G01N 30/48  
G01N 33/543  
// B01D 15/08  
G01N 33/544

---

(21)Application number : 04-176115

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD  
TAIYO KAGAKU CO LTD

(22)Date of filing : 09.06.1992

(72)Inventor : INAMORI KAZUNORI  
YOKOTA HIDEYUKI  
SEKO MASAHIRO  
TANAKA MASAKAZU  
KIN BUSAKU  
FUJIKI MASARU  
HATTA HAJIME

---

### (54) HEN' S EGG ANTIBODY IMMOBILIZED CARRIER AND IMMOBILIZING METHOD

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To realize hen' s egg antibody immobilized carrier and method for immobilizing hen' s egg antibody to water insoluble carrier without causing inactivation or denaturation.

CONSTITUTION: To realize hen' s egg antibody immobilized carrier and a method for immobilizing hen' s egg antibody wherein aldehyde group, formed through cleavage at the glycol site of sugar chain of hen' s egg antibody, and water insoluble carriers having amino group on the surface are employed in the formation of Schiff base which is subsequently reduced.

## Claims

[Claim 1] An immobilizing method of a hen's egg antibody immobilizing in an insoluble in water nature carrier by reduction this after making a Schiff base form by with an amino group of an insoluble in water nature carrier which having an amino group on the surface. An aldehyde group formed by oxidation cleavage of a glycol part of a sugar chain of a hen's egg antibody.

[Claim 2] A hen's egg antibody immobilization carrier, wherein it is immobilized by a method according to claim 1 and a hen's egg antibody is immobilized to an insoluble in water nature carrier in a part of the sugar chain.

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the immobilizing method and IgY immobilization support to an insoluble in water nature carrier of a hen's egg antibody (henceforth IgY), and in such fields as foodstuffs, animal feed, cosmetics, clinical diagnostic, a reagent for research, quasi drugs, and a passive immunity therapy, it is applicable to an affinity adsorbent, the carrier for affinity chromatography, a biosensor, enzyme immunoassay, etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] The IgY is made of the blood antibody of the adult chicken which carried out antigen sensitization which shifts into a hen's egg yolk. When the specific antibody obtained from a hen's egg yolk, i.e., IgY, is used, there are the following advantages as compared with the conventional method using the blood antibody of the mammals, such as a rabbit.

[0003] (1) Blood collecting operation is unnecessary to antibody preparation, and it can carry out to it by the easy method of egg gathering. (2) About ten hen's eggs are equivalent to a part for the whole blood of one rabbit as an amount of antibodies. Since a hen lays a 250-300-piece egg per year, mass production of a specific antibody is possible for it. (3) In a hen's egg yolk, since only

IgY exists as an antibody purification is easy as compared with the blood in which various antibody classes live together. (4) In the case of the hen, large-scale poultry farming is systematized, and an antibody is cheaply obtained from the breeding cost being cheap. (5) In the case of a hen, the vaccination aiming at prevention is systematized, and immunity to a lot of hens can be efficiently performed using it.

[0004] IgY has many characteristic character different chemically or physically from a mammalian antibody (especially IgG fraction). Paying attention to these points, application of IgY in wide range fields, such as products, such as foodstuffs, animal feed, cosmetics, clinical diagnostic, a reagent for research, and quasi drugs, and passive immunity therapies and the like, is tried in recent years. There are also application possibilities of enough to the carrier for affinity chromatographies, other adsorption material, etc.

[0005] There are many examples of a report for many years about the trial immobilizing a variety of proteins and peptides which has physiology activity, such as an antibody like IgY, an enzyme, hormone, and lectin, as ligand in these fields, to a carrier via a spacer depending on the case. The most is based on the reaction in the functional group of the amino acid residue which constitutes protein. For example, the epsilon-amino group of lysine, the amino group of the N terminal, the sulfhydryl group of cystein, the beta-carboxyl group of aspartic acid, the gamma-carboxyl group of glutamic acid, the carboxyl group of the C terminal, the phenolic hydroxyl group of tyrosine, serine or the hydroxyl group of threonine, the guanidino group of arginine, the imidazolyl group of histidine, the indolyl group of tryptophan, the methylsulfhydryl group of methionine, etc. However, since there are many especially contents of the hydroxyl group, the carboxyl group, and the amino group in protein, when these functional groups are made to react, the amino acid residue which forms the active center part may be modified or denatured, it follows on it and there is a problem of falling activity or deactivating.

[0006] Generally the proteinic bioactive substance like IgY tends to receive denaturation by operation of heat, acid, alkali, an

organic solvent, and the like, which are frequently used in the usual chemosynthesis. Therefore, in order to enable the bioactive substance which is ligand to hold physical or chemical nature as much as possible compared to before its immobilization, restrictions on an immobilized reaction condition increase in various aspects.

[0007] It also be required that the immobilized ligand is firmly immobilized also in various salt concentration and wide pH ranges, and a break through of ligand does not take place, and that the immobilized ligand can combine with the substance of purpose firmly, etc. When the immobilizing method of various bioactive substances is theoretically divided roughly, they are three kinds, (1) carrier binding method, (2) cross-linking method, and (3) entrapping elasticity. These methods have the strong point and demerit, respectively, and are properly used according to the kind of ligand and the purpose.

[0008] (1) A carrier binding method is a thing of the portion which does not have an adverse effect on the manifestation of the bioactivity in protein like IgY as much as possible which chooses especially a hydroxyl group, a carboxyl group, and an amino group, and is immobilized via a covalent bond, an ionic bond, a hydrophobic bond, biochemical unique combination, and the like in a carrier. Immobilization by a covalent bond includes activation according to a cyanogen bromide, azido-derivatize of carboxylic acid, the method of constructing a bridge with the compound which has a condensation reaction by a carbodiimide reagent, Woodward reagent K, etc., a diazo coupling reaction, and a functional group that is rich in two or more reactivity like glutaraldehyde, etc. Although these methods have a firm combination and there are the strong points; stability may be increased, there are demerits; fear of proteinic denaturation and an interaction with the quality of an object become difficult to happen.

[0009] The oxidative scission of the carbohydrate part of an antibody is further carried out to JP, 58-53757 A, and the method which the antibody which has an aldehyde group, and the carrier which has an amino group or hydrazide groups in a side chain immobilize via the

structure of  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  or  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$  is indicated. However, also in this method, since combination of a carrier and an antibody is direct, there is a problem that fully holding the function of an antibody and immobilizing it cannot prevent nonspecific adsorption of other protein difficult.

[0010] Although the simplicity of operation and the reproductive possible point of the immobilization by an ionic bond are advantageous, it is easy to be influenced by the kind of buffer solution used for reaction mixture, pH, ionic strength, temperature, etc. Generally in immobilization by physical adsorption, combination cannot acquire sufficient retention capacity in many cases.

[0011] (2) A cross-linking method is the method of making the reagent and ligand which have two or more functional groups, such as glutaraldehyde, toluene diisocyanate, hexamethylene diisocyanate, and cyanuric chloride, react, making construct a bridge between molecules, and using as a giant molecule. Although this method is often used for immobilization of a microbial cell, it is not so effective in immobilization of the bioactive substance of a protein system.

[0012] (3) Entrapping elasticity is the method of shutting up ligand in polymer gel. There are a skeleton pattern which confines ligand in the inside of the gel of naturally-occurring polymers like protein or polysaccharide or various synthetic macromolecules, a microcapsule type which wraps in ligand by the polymers tunic of semipermeable membrane nature, a liposome type which wraps in ligand to liquid membrane like phospholipids and the like, at this. There is also the method of shutting up ligand all over the space divided with the inside of a hollow child film or ultrafiltration membrane. Although these methods have the immobilizable strong point, ornamentation of ligand not taking place easily due to immobilization, and maintaining a natural state, there is a fault, like inactivation takes place by that it is hard to receive an operation of the substance of the amount of polymers or conditions.

[0013]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention solves

various faults in the above-mentioned conventional technology, and it is efficient and it tends to provide the immobilizing method and IgY immobilization support of IgY which made as small as possible a possibility of having reduced the bioactivity moreover or making it denaturalizing.

[0014]

[Means for Solving the Problem] An aldehyde group in which an immobilizing method by this invention which attained the above-mentioned purpose is formed by oxidation cleavage of a glycol part of a sugar chain of a hen's egg antibody, after making a Schiff base form in the surface by an amino group of an insoluble in water nature carrier which has an amino group, by returning this, it has a gist to immobilize in an insoluble in water nature carrier. According to the described method, a hen's egg carrier by which a hen's egg carrier was immobilized to an insoluble in water nature carrier by the sugar chain part is obtained.

[0015]

[Function] It found out that this invention persons did not make the functional group in the amino acid residue which constitutes protein like the conventional method react as a result of being able to carry out efficiently and examining many things about the immobilizing method of IgY with little inactivation moreover, but what is necessary was just to make the functional group in a proteinic sugar chain react.

[0016] Although existence of many things is known, glycoprotein like IgY, it is thought that a biochemical meaning and role of the sugar chain part are peculiar to each and various, and it is carried out participating in the operation which generally improves or defends the stability to heat, various denaturing agents, a dialytic ferment (protease), and the like, or maintenance of higher order structure in many cases. However, influence on change of the bioactivity by there being almost nothing, when it is thought that it has influenced greatly about the manifestation of the bioactivity, and embellishing a sugar chain part is small if it compares with the case where the amino acid residue which constitutes the protein portion is embellished. In the case of an antibody like especially

IgY, the sugar chain part exists in the portion left with the antigen binding site, and it can be said that there is little the influence. [0017]The insoluble in water nature carrier used by this invention has an amino group, or easily introduction of an amino group, for example, especially if it has an aldehyde group and a functional group like an epoxy group, will not be limited but, as a typical thing, polystyrene, polymethacrylic acid, and its derivative, or synthetic high polymers, such as these copolymers and also polyvinyl alcohol, and styrene divinylbenzene copolymer, refining naturally-occurring-polymers compounds, such as naturally-occurring-polymers compounds, such as cellulose, a kitchen, chitosan, and agarose, or acyl cellulose, and an acyl kitchen, etc. are mentioned. When a mechanical strength etc. are taken into consideration among the illustrated high molecular compounds, polystyrene and poly methyl methacrylate which constructed the bridge moderately and its derivative or these copolymers, cellulose, and a kitchen are desirable. What is necessary is just to choose suitably what has the features, such suitable gel strength, particle diameter, and a pole diameter, according to its purpose and use from these. It is not limited especially concerning the gestalt of a carrier and the shape of a bead, fibrous, the shape of a film (a hollow fiber is included) and the like, can be applied also in any according to the use and purpose. Although the to some extent larger ones are connected with improvement in a ligand introduction rate, since a gel strength will fall if too not much large, the content of the amino group in a carrier is not suitable. Therefore, it is desirable to introduce so that it may become the range of 0.01 - 0.80 meq/ g, and it needs to adjust the value according to the size of ligand or the quality of an object. [0018]Although it is also possible to immobilize IgY directly in these carriers, it is more desirable to introduce IgY as ligand further, after combining with both ends as boil and show the example for example, in a lower type the poly (oxyethylene) (henceforth PEO amine) which has an amino group as a hydrophilic spacer, in combining the substance of a protein system generally

$$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$$

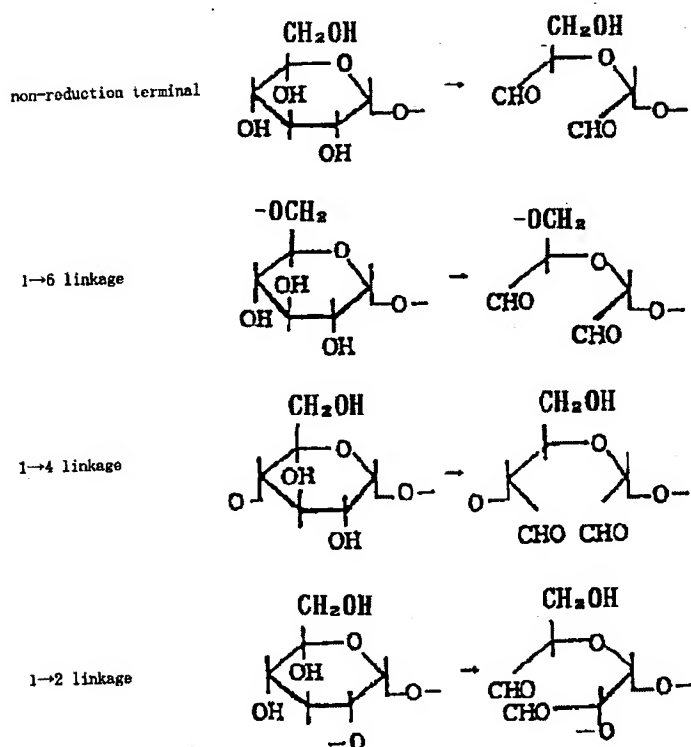
When using a hydrophilic nature spacer, it is necessary to adjust suitably according to the size and character of the quality of an object which are combined with ligand also about the chain length but, for example, the case where PEO amine is used a degree of polymerization; the range of 10-500, desirable 30-400, more preferably 100-300 is suitable. By introducing a hydrophilic spacer, steric exclusion can become small and unity with the quality of an object can be raised greatly. Furthermore by improvement in the excluded volume effect by a hydrophilic spacer, and hydrophilic nature, nonspecific adsorption can be suppressed.

[0019]As for introduction of the aldehyde group to the sugar chain part in IgY which is ligand on the other hand, it is preferred to carry out by oxidizing with periodic acid or its salt, cleaving a glycol part, and making an aldehyde group form. It is shown clearly that glucose residue exists in that sugar chain very mostly in IgY as compared with mammals IgG, and use of this reaction is effective. The oxidation reaction by periodic acid is produced between the hydroxyl groups in which a glycol part adjoins, 1 mol  $\text{IO}_4^-$  is returned to  $\text{IO}_3^-$ , and a 2-mol aldehyde group is formed of things. Although the structure of the reactant obtained changes with kinds of glycoside linkage, a thing as shown in a following formula can be considered.

[0020]

[Formula 1]



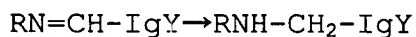


[0021]As for the quantity of periodic acid, it is desirable to make it react to IgY using the excessive amount more than the mol. Although it is preferred to carry out by 3-6 as for the pH value of reaction time, it is more preferred to carry out by pH 4-5 in consideration of the point of the stability of IgY or the ease of generating of a side reaction. It is appropriate for reaction mixture to use acetic acid or citrate buffer solution of about 0.1M. A room temperature or less than it of reaction temperature is preferred, and it is most ideal to carry out at 5 °C. Although a room temperature is enough as reaction time within in 1 hour, it is necessary to carry out at 5 °C for about 12 to 24 hours.

[0022]It is necessary to add substances, such as ethylene glycol, glycerin, and sodium sulfite, after the end of oxidation reaction, and to remove a superfluous oxidizer. It is more preferred to remove these substances by performing dialysis processing at 5 °C for 12 hours or more by using as outside liquid the buffer solution used on the occasion of oxidation reaction.

[0023] In this way, the carrier and Schiff base with which the above PEO amine combined IgY into which the obtained aldehyde group was introduced are made to form, and it joins together. It is more desirable to perform this reaction at a room temperature or 5 °C, to perform pH in 6-10 for 10 to 30 hours, and to carry out in the range of pH 8-9.5. It is preferred to use about 0.1M carbonic acid buffer solution as reaction mixture.

[0024] In this way, the obtained Schiff base is lacking in stability, and it is especially easy to receive decomposition under acid or alkaline conditions. Then, as shown in a following formula (the inside R of a formula expresses a carrier), it is suitable to make it stabilize by performing a reduction reaction.



As for the reduction reaction of a Schiff base, it is preferred that addition of sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) or cyanosodium borohydride (NaBH<sub>3</sub>CN) performs. As for a reaction, in a room temperature or 5 °C, it is desirable to carry out in the carbonic acid buffer solution of pH 8-9 for 3 to 30 hours.

[0025] In order to introduce as ligand IgY which introduced the aldehyde group into the sugar chain into the insoluble in water nature carrier which has an amino group on the surface in the immobilizing method of this invention, especially if based on the above methods, it will not be limited, either, but the following methods are preferred when introducing IgY via PEO amine as a hydrophilic spacer, for example by making porosity cellulose into a carrier.

[0026] (1) Refining of cellulose

0.1-5.0 N of sodium periodate adds, and it is 20-30°C preferably, and 10-50 °C of granular porosity cellulose whose mean particle diameter is 20-2000 micrometers and whose average pore size is 200-30000 Å is made to react to the solution which dissolved in 0.5-1.5 N sulfuric acid preferably for 10 to 24 hours, preferably for 5 to 30 hours. The sodium periodate concentration of the above-mentioned sodium periodate sulfuric acid solution is 4 to 10 % of the weight preferably two to 15% of the weight. The bath ratio to the sodium periodate solution of the above-mentioned granular

porosity cellulose 10 to 30 volume %, it is 15 to 25 volume % preferably. Filtering this reaction mixture, collecting output and fully washing in the swollen state, the aldehyde content 0.10 - 4.00 meq/g, desirable [aldehyde] - [cellulose] of 0.20 - 1.00 meq/g is obtained. This [aldehyde]-[cellulose] has the structure in which some glucose units as shown previously carried out ring breakage.

[0027] (2) The introductory of a spacer

Degree of polymerization 10-500, desirable 30-400 dissolve PEO amine of 100-300 in pH 9.5 carbonic acid buffer solution still more preferably. Adding and stirring to this [aldehyde]-[cellulose] obtained above (1), it is 20-30°C preferably 10-50°C is made to react preferably for 10 to 24 hours for 5 to 30 hours. The concentration of the above-mentioned PEO amine is 0.4 to 3.0 % of the weight preferably 0.2 to 5.0% of the weight and the bath ratio of [aldehyde] - [cellulose] to this solution is 3 - 20 volume %, it is 5 - 15 volume % preferably. This reaction mixture is filtered, output is collected and rinsed, and [PEO amine]-[cellulose] is obtained.

[0028] (3) Refining of an IgY sugar chain

Homo sapiens low-density lipoprotein (henceforth hLDL) with Freund's complete adjuvant. Anti-hLDL-IgY which obtained the supernatant liquid produced from the egg yolk portion of the hen's egg of the leghorn which carried out immunity by mixing in lambda carrageenan solution and centrifuging by refining it by an ion-exchange chromatography and curing salting 10-20 mg, it dissolves in 20-50 ml of acetic acid buffer solution of pH 4.5, 1-5 mg of sodium periodate is added, and it stirs at a room temperature, and is made to react for 30 minutes - 1 hour. Furthermore, add ethylene glycol so that it may become 0.1 M concentration, and it is made to react at 5°C for 5 to 10 hours, the above-mentioned acetic acid buffer solution is used as outside liquid for this reaction mixture, and dialysis is performed at 5°C for 12 to 24 hours. In this way, a [aldehyde]-[IgY] solution is obtained.

[0029] (4) The introductory of IgY

After adding pH 9.5 carbonic acid buffer solution to the [aldehyde]-[IgY] solution obtained by the introductory above (3)

of IgY and adjusting pH to 8.0-9.0, add [PEO amine]-[cellulose] 3g (swollen state) obtained above (2), it is made to react at 5°C for 20 to 30 hours, and a Schiff base is made to form. This reaction mixture is filtered, output is collected, it fully washes, pH 9.0 carbonic acid buffer solution is added by a swollen state, 0.2-1g of sodium borohydride is added further, and stirring performs a reduction reaction at 5°C for 5 to 15 hours. What immobilized the anti-hLDL antibody in cellulose via PEO amine as a spacer is obtained by filtering this reaction mixture, collecting output and fully washing.

[0030]

[Example] Although this invention is explained using an example below, the following example does not restrict this invention and all the things done for change implementation in the range which does not deviate from the meaning of front and a postscript are included by the technical scope of this invention.

[0031] <Example 1> Immobilization of anti-hLDL-IgY

Immobilization to the porosity cellulose of anti-hLDL-IgY produced from the egg yolk of the leghorn which carried out immunity of the immobilization hLDL (made in Chemi-Con) by extracting and refining was carried out as follows.

[0032] 800 mg of sodium periodate is dissolved in 200 ml of 1N sulfuric acid, after adding 20 g of porosity cellulose ("CELLULOFINE CPCm" by Chisso Corp.) and making it react by stirring for 20 hours, the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [aldehyde]-[cellulose] was obtained. The aldehyde content performed an immobilized quantity by the oxime process, and was 0.55 meq/g.

[0033] Dissolved 2 g of PEO amine of the molecular weight 5000 in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, add the above-mentioned [aldehyde]-[cellulose] 5g, and it was made to react by stirring, and the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO amine]-[cellulose] was obtained. When the amino group content performed an immobilized quantity with the potentiometric titration by chloride using "COMTITE101" by Hiranuma Sangyo, it was 0.20 meq/g.

[0034] On the other hand, the above-mentioned IgY 40mg was dissolved in pH 4.5 citrate buffer solution at 50 ml, 50 mg of sodium periodate was added, and it was made to react at a room temperature by stirring for 45 minutes. Added so that it might become 0.1 M concentration, and stir ethylene glycol for 7 hours, it was made to react at 5°C furthermore, the above-mentioned buffer solution was used as outside liquid for reaction mixture, dialysis processing was performed at 5°C overnight, and the [aldehyde]-[IgY] solution was obtained.

[0035] Carbonic acid buffer solution was added for above-mentioned [aldehyde]-[IgY] liquid, pH was adjusted to 9.0, above-mentioned [PEO amine]-[cellulose] 1 g was added, it stirred at 5°C for 30 hours, and the Schiff base was made to form. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, 50 ml of pH 8.0 carbonic acid buffer solution and 200 mg of sodium borohydride were added, and the reduction reaction was performed at 5°C for 7 hours. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained.

[0036] The amount of immobilization of IgY settles the residual liquor of a Schiff base reaction with a trichloroacetic acid solution, 27.9 mg was immobilized when what was dissolved in sodium hydroxide solution was computed by quantifying ullaage with the reagent for BCA protein quantification (made by a pierced earring company) (henceforth the TCA-BCA method).

[0037] 1 ml of cellulose gel which immobilized the above IgY is mixed with 2 ml of swine blood serums (LDL value of 150.5mg/ml) in 20 ml vial, after incubating by shaking for 30 minutes at 30°C, LDL value of centrifugal supernatant is determined quantity with "beta lipoprotein C test -WAKO" (made by Wako Pure Chemical Industries). The result of having computed LDL surface coverage from the obtained residual LDL value is shown in Table 1.

[0038]

[Table 1]

	LDL absorption rate (%)
Example 1	70.4
Example 2	53.4
Comparative example 1	13.7
Comparative example 2	21.6

[0039]<Example 2> Immobilization of anti-hLDL-IgY

110 g of tetraethylenepentamine is dissolved in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, added [aldehyde]-[cellulose] 10g prepared in Example 1, it was made to react by stirring, the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [amine]-[cellulose] was obtained. The amino group content was 0.27 meq/g.

[0040]On the other hand, IgY 40mg in Example 1 was dissolved in 50 ml of pH 4.5 citrate buffer solution, 50 mg of sodium periodate was added, and it was made to react at a room temperature by stirring for 45 minutes. Added so that it might become 0.1 M concentration, and stir ethylene glycol for 7 hours, it was made to react at 5°C furthermore, the above-mentioned buffer solution was used as outside liquid for reaction mixture, dialysis processing was performed at 5°C overnight, and the [aldehyde]-[IgY] solution was obtained.

[0041]Carbonic acid buffer solution was added for above-mentioned [aldehyde]-[IgY] liquid, pH was adjusted to 9.0, above-mentioned [amine]-[cellulose] 5g was added, it stirred at 5°C for 30 hours, and the Schiff base was made to form. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, 50 ml of pH 8.0 carbonic acid buffer solution and 200 mg of sodium borohydride were added, and the reduction reaction was performed at 5°C for 7 hours. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained. 30.5 mg was immobilized when the amount of immobilization of IgY computed the amount of IgY(s) of the residual liquor of a Schiff base reaction by having quantified it by the TCA-BCA method. It asked for LDL

surface coverage like Example 1 about this IgY immobilization support. The result is shown in Table 1.

[0042] <Example 3> Immobilization of anti-endotoxin IgY

The lipid A (made by Ribl) of the E.coli J5 origin which combined with hapten bovine albumin is extracted and refined from the egg yolk of the leghorn which carried out immunity. Immobilization to the obtained porosity cellulose of anti-hLDL-IgY was carried out as follows.

[0043] 800 mg of sodium periodate is dissolved in 200 ml of 1N sulfuric acid, after adding 20 g of porosity cellulose ("CELLULOFINE GCL-1000m" by Chisso Corp.) and making it react by stirring for 20 hours, the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [aldehyde]-[cellulose] was obtained. When the aldehyde content performed an immobilized quantity by the oxime process, it was 0.43 meq/g.

[0044] Dissolved 4 g of PEO amine of the molecular weight 1000 in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, add the above-mentioned [aldehyde]-[cellulose] 5g, and it was made to react by stirring, and the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO amine]-[cellulose] was obtained. The amino group content was 0.22 meq/g.

[0045] On the other hand, the above-mentioned IgY 20mg was dissolved in 50 ml of pH 4.5 citrate buffer solution, 50 mg of sodium periodate was added, and it was made to react at a room temperature by stirring for 45 minutes. Added so that it might become 0.1 M concentration, and stir ethylene glycol for 7 hours, it was made to react at 5°C furthermore, the above-mentioned buffer solution was used as outside liquid for reaction mixture, it dialyzed at 5°C overnight, and the [aldehyde]-[IgY] solution was obtained.

[0046] Carbonic acid buffer solution was added for above-mentioned [aldehyde]-[IgY] liquid, pH was adjusted to 9.0, above-mentioned [PEO amine]-[cellulose] 1g was added, it stirred at 5°C for 30 hours, and the Schiff base was made to form. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, 50 ml of pH 8.0 carbonic acid buffer solution and 200 mg of sodium borohydride were added, and the reduction reaction was performed at 5°C for 7 hours.

The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained. The amount of immobilization of IgY was computed like Example 1, and 17.3 mg was immobilized.

[0047] Into 20 ml vial which sterilized 100 mg of carriers which freeze-dried the cellulose which immobilized the above IgY, weighing was carried out and 5 ml of lipopolysaccharide (product made by Difco called LPS below) physiological saline solutions of 10 ng/ml E.coli 0111:B4 origin were added. After incubating shaking at 37°C for 2 hours, concentration of residual LPS in the filtrate was determined quantity with "TOKISHINO meter ET" (made by Wako Pure Chemical Industries). The result is shown in Table 2.

[0048]

[Table 2]

	concentration of residual LPS (ng/ml)
Example 3	0.05
Comparative example 3	3.22

[0049] Immobilization to the porosity cellulose of the anti human hemoglobin IgY produced from the egg yolk of the leghorn which carried out immunity of the immobilized human hemoglobin (made by a bio-zyme laboratory company) of <Example 4> anti human hemoglobin IgY by extracting and refining was carried out as follows.

[0050] 800 mg of sodium periodate is dissolved in 200 ml of 1 N sulfuric acid, after adding 20 g of porosity cellulose ("CELLULOFINE GCL-1000m" by Chisso Corp.) and making it react by stirring for 20 hours, the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [aldehyde]-[cellulose] was obtained. The aldehyde content performed an immobilized quantity by the oxime process, and was 0.48 meq/g.

[0051] Dissolved 1 g of PEO amine of the molecular weight 4000 in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, add the above-mentioned [aldehyde]-[cellulose] 5g, and it was made to react by stirring, and the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO amine]-[cellulose] was



obtained. The amino group content was 0.22 meq/ g.

[0052]On the other hand, 20 mg of the above-mentioned antibodies were dissolved in pH 4.5 citrate buffer solution at 50 ml, 50 mg of sodium periodate was added, and it was made to react at a room temperature by stirring for 45 minutes. Added so that it might become 0.1 M concentration, and stir ethylene glycol for 7 hours, it was made to react at 5°C furthermore, the above-mentioned buffer solution was used as outside liquid for reaction mixture, it dialyzed at 5°C overnight, and the [aldehyde]-[IgY] solution was obtained.

[0053]Carbonic acid buffer solution was added in above-mentioned [aldehyde]-[IgY] liquid, pH was adjusted to 9.0, above-mentioned [PEO amine]-[cellulose] 1g was added, it stirred at 5°C for 30 hours, and the Schiff base was made to form. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, 50 ml of pH 8.0 carbonic acid buffer solution and 200 mg of sodium borohydride were added, and the reduction reaction was performed at 5°C for 7 hours. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilized antibody was obtained. 17.1 mg was immobilized when the amount of immobilization of the antibody was computed like Example 1.

[0054]Taking 1 ml of cellulose which immobilized the above IgY in 20 ml vial, adding the human hemoglobin solution of 200 mg/dl, performing centrifugal separation after 5 hour shake, and determining quantity of the human hemoglobin concentration of the supernatant liquid with TMB (tetramethyl benzidine) method. The result is shown in Table 3.

[0055]

[Table 3]

	Concentration of residual human hemoglobin (mg/dl)
Example 4	7.2
Comparative example 4	29.2

[0056]<Comparative example 1> Immobilization of anti-hLDL-IgY

After dissolving 23 g of poly (oxyethylene) (henceforth PEO acid) of the molecular weight 5000 which has a carboxyl group in the both ends in pH 4.5 citrate buffer solution and ice-cooling, 1 mg of 1-ethyl- 3 -(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide (henceforth EDC) was added and it stirred for 30 minutes. [Amine]-[cellulose] 5g prepared in Example 1 after that is added, and it stirred for 20 hours and was made to react at a room temperature. The reactant was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO acid]-[cellulose] was obtained.

[0057]After dissolving IgY 40mg in Example 1 in pH 4.5 citrate buffer solution and ice-cooling, 1-mg EDC was added and it stirred for 30 minutes. Then, [PEO acid] - [cellulose] was added, and it was made to stir and react at a room temperature. The reactant was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained. 27.7 mg was immobilized when the amount of immobilization of IgY computed the amount of IgY(s) of the residual liquor of a Schiff base reaction by having quantified it by the TCA-BCA method. It asked for LDL surface coverage like Example 1 about this IgY immobilization support. The result is shown in Table 1.

[0058]<Comparative example 2> Immobilization of anti-hLDL-IgY  
2 g of PEO amine of the molecular weight 5000 is dissolved in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, add [aldehyde]-[cellulose] 5g in Example 1, and it was made to react by stirring, and the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO amine]-[cellulose] was obtained. The amino group content performed an immobilized quantity with the potentiometric titration by chloride, and the amino group content was 0.21 meq/ g.

[0059] Above-mentioned [PEO amine]-[cellulose] was suspended to 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, 2 ml of glutaraldehyde solution was added 25%, and it was made to react by stirring at a room temperature for 20 hours. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO aldehyde]-[cellulose] was obtained. The aldehyde content performed an immobilized quantity by the oxime process, and was 0.38

meq/ g.

[0060] IgY 40mg in Example 1 was dissolved in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, above-mentioned [PEO aldehyde]-[cellulose] was added, and it was made to react by stirring at a room temperature for 20 hours. Filtered the reaction mixture, collected output, fully washed, 50 ml of pH 9.0 carbonic acid buffer solution was made suspended,  $\text{NaBH}_4$  1 g was added, and it was made to react by stirring at a room temperature for 10 hours. The reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained. The amount of immobilization of IgY computed the amount of IgY(s) of the residual liquor of a Schiff base reaction by having quantified it by the TCA-BCA method, and 22.0 mg was immobilized. It asked for LDL surface coverage like Example 1 about this IgY immobilization support. The result is shown in Table 1.

[0061] <Comparative example 3> Immobilization of the anti-endotoxin IgY

110 g of tetraethylenepentamine is dissolved in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, added [aldehyde]-[cellulose] 10g prepared in Example 3, it was made to react by stirring, the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [amine]-[cellulose] was obtained. The amino group content performed an immobilized quantity with the potentiometric titration by chloride, and was 0.31 meq/g.

[0062] After dissolving the PEO acid 23g of the molecular weight 1000 in pH 4.5 citrate buffer solution and ice-cooling, 1-mg EDC was added and it stirred for 30 minutes. Then, [amine] - [cellulose] 5g is added, and it stirred for 20 hours and was made to react at a room temperature. The reactant was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO acid]-[cellulose] was obtained.

[0063] After dissolving IgY 40mg in Example 3 in pH 4.5 citrate buffer solution and ice-cooling, 1-mg EDC was added and it stirred for 30 minutes. Then, [PEO acid] - [cellulose] was added, and it was made to stir and react at a room temperature. The reactant was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained. The amount of immobilization of IgY computed the

amount of IgY(s) of the residual liquor of a Schiff base reaction by having quantified it by the TCA-BCA method, and 28.4 mg was immobilized. The amount of adsorption LPS was determined quantity as Example 3 for these IgY immobilized carrier. The result is shown in Table 2.

[0064]<Comparative example 4> Immobilization of the anti-hemoglobin IgY

110 g of tetraethylenepentamine is dissolved in 50 ml of pH 9.5 carbonic acid buffer solution, added [aldehyde]-[cellulose] 10 g prepared in Example 4, it was made to react by stirring, the reaction mixture was filtered, output was collected, it fully washed, and [amine]-[cellulose] was obtained. The amino group content performed an immobilized quantity with the potentiometric titration by chloride, and was 0.31 meq/g.

[0065]After dissolving the PEO acid 23g of the molecular weight 4000 in pH 4.5 citrate buffer solution and ice-cooling, 1-mg EDC was added and it stirred for 30 minutes. Then, [amine] - [cellulose] 5 g is added, and it stirred for 20 hours and was made to react at a room temperature. The reactant was filtered, output was collected, it fully washed, and [PEO acid]-[cellulose] was obtained.

[0066]After dissolving IgY40mg in Example 3 in pH 4.5 citrate buffer solution and ice-cooling, 1 mg EDC was added and it stirred for 30 minutes. Then, [PEO acid] - [cellulose] was added, and it was made to stir and react at a room temperature. The reactant was filtered, output was collected, it fully washed, and the immobilization IgY was obtained. The amount of immobilization of IgY computed the amount of IgY(s) of the residual liquor of a Schiff base reaction by having quantified it by the TCA-BCA method, and 27.2 mg was immobilized. The amount of adsorption human hemoglobin as Example 4 for these IgY immobilized carrier. The result is shown in Table 3.

[0067]

[Effect of the Invention]It became possible to immobilize in an insoluble in water nature carrier, without having deactivated the activity or denaturing IgY by this invention, and it became possible to provide the IgY immobilization support which maintained activity

Publication number: 05-340948

Date of publication of application: 24. 12. 1993

near before immobilization. This invention is useful in wide range fields, such as adsorption material, a carrier for affinity chromatography, enzyme immunoassay, and a biosensor.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-340948

(43)公開日 平成5年(1993)12月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/547		9015-2 J		
B 0 1 J 20/26	H	7202-4 G		
G 0 1 N 30/48	R	8310-2 J		
33/543	Q	9217-2 J		
// B 0 1 D 15/08				

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-176115	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成4年(1992)6月9日	(71)出願人	000204181 太陽化学株式会社 三重県四日市市赤堀新町9番5号
		(72)発明者	稲森 和紀 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内
		(72)発明者	横田 英之 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 植木 久一
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 鶏卵抗体固定化担体およびその固定化方法

## (57)【要約】

【目的】 活性を失活させたり変性させたりすることのない水不溶性担体への鶏卵抗体の固定化方法および鶏卵抗体固定化担体を提供する。

【構成】 鶏卵抗体の糖鎖のグリコール部位の開裂により形成されたアルデヒド基を、表面にアミノ基を有する水不溶性担体とシッフ塩基を形成させた後これを還元することによる鶏卵抗体の固定化方法およびその方法で固定化された鶏卵抗体固定化担体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 鶏卵抗体の糖鎖のグリコール部位の酸化開裂により形成されるアルデヒド基と、表面にアミノ基を有する水不溶性担体のアミノ基とでシッフ塩基を形成させた後これを還元することにより、水不溶性担体に固定化することを特徴とする鶏卵抗体の固定化方法。

【請求項2】 請求項1記載の方法によって固定化されたものであり、鶏卵抗体がその糖鎖の部位において水不溶性担体に固定されたものであることを特徴とする鶏卵抗体固定化担体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は鶏卵抗体（以下IgYという）の水不溶性担体への固定化方法およびIgY固定化担体に関するものであり、食品、動物飼料、化粧品、臨床検査薬、研究用試薬、医薬部外品や受動免疫療法等の分野で、アフィニティー吸着材、アフィニティークロマト用担体、バイオセンサー、エンザイムイムノアッセイなどに応用が可能なものである。

## 【0002】

【従来の技術】 IgYは抗原感作した親鶏の血液抗体が鶏卵卵黄中へ移行したものである。鶏卵卵黄より得られる特異抗体、即ちIgYを用いた場合、ウサギなどの哺乳類の血液抗体を用いる従来法に比較して下記のような利点がある。

【0003】 ①抗体調製に採血操作が不要で、採卵という簡単な方法で行える。②抗体量として鶏卵10数個がウサギ1頭の全血分に相当する。また、鶏は年間250～300個の卵を産むため、特異的抗体の大量生産が可能である。③鶏卵卵黄中には、抗体としてIgYのみが存在し、種々の抗体クラスが共存する血液と比較して抗体精製が容易である。④鶏の場合大規模養鶏がシステム化されており、その飼育コストも安価であることから、安価に抗体が得られる。⑤鶏の場合、鶏病予防を目的としたワクチネーションがシステム化されており、それを利用して大量の鶏への免疫が効率よく行える。

【0004】 またIgYは哺乳類の抗体（特にIgG画分）とは化学的あるいは物理的に異なる多くの特有な性質を有している。これらの点に着目して近年食品、動物飼料、化粧品、臨床検査薬、研究用試薬、医薬部外品などの製品や受動免疫療法など広範囲な領域におけるIgYの応用が近年試みられている。またアフィニティークロマトグラフィ用担体やその他の吸着材などへの応用の可能性も十分にある。

【0005】 これらの分野でリガンドとしてIgYのような抗体、酵素、ホルモン、レクチンなど生理活性を有する種々のタンパク質やペプチドを、場合によってはスパーサーを介して担体に固定化を行なう試みについては、古くから多くの報告例がある。その大部分はタンパク質を構成しているアミノ酸残基の官能基における反応

によるものである。たとえばリジンのε-アミノ基、N末端のアミノ基、システインのスルフヒドリル基、アスパラギン酸のβ-カルボキシル基、グルタミン酸のγ-カルボキシル基、C末端のカルボキシル基、チロシンのフェノール性水酸基、セリンあるいはトレオニンの水酸基、アルギニンのグアニジノ基、ヒスチジンのイミダゾリル基、トリプトファンのインドリル基、メチオニンのメチルメルカプト基などである。ところがタンパク質中特に水酸基、カルボキシル基、アミノ基の含量は多いので、これらの官能基を反応させた場合、活性中心部位を形成しているアミノ酸残基を修飾あるいは変性させる可能性があり、それに伴い活性を低下あるいは失活させるという問題がある。

【0006】 また一般にIgYのようなタンパク質系の生理活性物質は、通常の化学合成において頻繁に用いられる熱、酸、アルカリ、有機溶媒などの作用により変性を受けやすい。したがってリガンドである生理活性物質が固定化前と同等にできる限り近い物理的あるいは化学的性質を保持できるようにするには、固定化反応条件において様々な面で制約が多くなる。

【0007】 また固定化されたりガンドが種々の塩濃度や広いpH範囲においてもしっかりと固定化されりガンドの漏出が起らないことや、固定化されたりガンドが目的とする物質と強固に結合できることなどが条件となる。種々の生理活性物質の固定化方法を原理的に大別すると①担体結合法、②架橋法、③包括法の3種類である。これらの方法はそれぞれ長所、短所を有しており、リガンドの種類や目的に応じて使い分けられている。

【0008】 ①担体結合法はIgYのようなタンパク質中の生理活性の発現に可能な限り悪影響を与えない部分の、特に水酸基、カルボキシル基、アミノ基を選択して、担体に共有結合、イオン結合、疎水結合、生化学的特異結合などを介して固定化するものである。共有結合による固定化には臭化シアンによる活性化、カルボン酸のアジド誘導体化、カルボジイミド試薬やウッドワード試薬Kなどによる縮合反応、ジアゾカップリング反応、グルタルアルデヒドのような2つ以上の反応性に富む官能基を有する化合物により架橋する方法などがある。これらの方法は結合が強固であり、安定性を増す場合があるなどの長所があるが、タンパク質の変性の恐れや、目的物質との相互作用が起りにくくなる場合があるなどの短所がある。

【0009】 特開昭58-53757にはさらに抗体の炭水化物部位を酸化切断し、アルデヒド基を有する抗体と側鎖にアミノ基またはヒドラジド基を有する担体とが、 $-CH_2-NH-$ または $-CH_2-NH-NH-CO-$ の構造を介して固定化する方法が記載されている。しかしこの方法においても、担体と抗体の結合が直接的であるため、抗体の機能を十分に保持し固定化することが困難であり、また他のタンパク質の非特異的吸着を防止

できないという問題がある。

【0010】またイオン結合による固定化は操作の簡便さや再生の可能な点が有利であるが、反応液に用いる緩衝液の種類、pH、イオン強度、温度などの影響を受けやすい。物理的吸着による固定化では結合が一般に十分な保持能力を得られないことが多い。

【0011】②架橋法はグルタルアルデヒド、トルエンジイソシアナート、ヘキサメチレンジイソシアナート、シアヌロクロリドなどの2つ以上の官能基を有する試薬とリガンドを反応させて分子間で架橋させて巨大分子とする方法である。この方法は微生物菌体の固定化にはしばしば用いられるが、タンパク質系の生理活性物質の固定化にはあまり有効なものではない。

【0012】③包括法は高分子ゲル内にリガンドを閉じ込める方法である。これにはタンパク質や多糖類のような天然高分子あるいは種々の合成高分子のゲルの内部にリガンドを閉じ込める格子型、半透膜性の高分子被膜によりリガンドを包み込むマイクロカプセル型、リン脂質のような液体膜にリガンドを包み込むリポソーム型などがある。また中空子膜内や限外濾過膜で仕切られた空間中にリガンドを閉じ込める方法もある。これらの方法は固定化によりリガンドの修飾が起りにくく、自然な状態を保ったままで固定化が可能である長所があるが、高分子量の物質の作用を受けにくいことや条件により失活が起こるなどの欠点がある。

#### 【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の従来技術における種々の欠点を解決し、効率よく、しかもその生理活性を低下させたり変性させたりする可能性をできる限り小さくしたI g Yの固定化方法およびI g Y固定化担体を提供しようとするものである。

#### 【0014】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成した本発明による固定化方法は鶏卵抗体の糖鎖のグリコール部位の酸化開裂により形成されるアルデヒド基と、表面にアミノ基を有する水不溶性担体のアミノ基とでシッフ塩基を形成させた後これを還元することにより、水不溶性担体に固定化することに要旨を有する。また上記方法によれば、鶏卵担体とその糖鎖部分で水不溶性担体に固定された鶏卵担体を得られる。

#### 【0015】

【作用】本発明者等は、効率よく行え、しかも失活の少ないI g Yの固定化方法について種々検討した結果、従来の方法のようにタンパク質を構成しているアミノ酸残基中の官能基を反応させるのではなく、タンパク質の糖鎖中の官能基を反応させれば良いことを見出した。

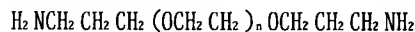
【0016】I g Yのような糖タンパク質は多くのものの存在が知られているが、その糖鎖部分の生化学的な意義や役割はそれぞれに特有で様々であると考えられており、一般的には熱、各種変性剤、分解酵素（プロテアー

ゼ）などに対する安定性を高めたり防御したりする作用や、あるいは高次構造の維持に関与する場合が多いとされている。しかしその生理活性の発現に関しては大きく影響していると考えられる場合はほとんどなく、糖鎖部分を修飾することによる生理活性の変化に対する影響は、タンパク質部分を構成しているアミノ酸残基を修飾する場合と比較すれば小さいものである。特にI g Yのような抗体の場合には糖鎖部位はその抗原結合部位とは離れた部分に存在しておりその影響は少ないと言える。

【0017】本発明で用いる水不溶性担体は、アミノ基を有しているか、あるいはアミノ基の導入が容易である、たとえばアルデヒド基、エポキシ基のような官能基を有しているものであれば特に限定されないが、代表的なものとしてはポリスチレン、ポリメタクリル酸およびその誘導体、あるいはこれらの共重合体、更にはポリビニルアルコール、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体などの合成高分子化合物、セルロース、キチン、キトサン、アガロースなどの天然高分子化合物またはアシルセルロース、アシルキチンなどの改質天然高分子化合物などが挙げられる。例示した高分子化合物のうち、機械的強度等を考慮すると、適度に架橋したポリスチレン、ポリメタクリル酸メチルおよびその誘導体あるいはこれらの共重合体、セルロース、キチンが望ましい。これらの中からその目的・用途に応じて適切なゲル強度、粒子径、細孔径等の特徴を有するものを適宜選択すれば良い。担体の形態に関しても特に限定されるものではなく、その用途や目的に応じてビーズ状、繊維状、膜状（中空糸膜を含む）などいずれにおいても適用できるものである。担体におけるアミノ基の含量はある程度多い方がリガンド導入率の向上に結びつくが、あまり多過ぎるとゲル強度が低下するので適当ではない。したがって0.01~0.80 meq/gの範囲になるように導入するのが望ましく、リガンドや目的物質の大きさに応じてその値を調整する必要がある。

【0018】これらの担体に直接I g Yを固定化することも可能ではあるが、一般的にタンパク質系の物質を結合させる場合にはたとえば下式にその一例を示すような両末端にアミノ基を有するポリ（オキシエチレン）

（以下PEOアミンと言う）を親水性スパーサーとして結合させた後に、さらにI g Yをリガンドとして導入する方がより好ましい。



親水性スパーサーを用いる場合にその鎖長についてリガンドに結合させる目的物質の大きさや性質に応じて適当に調整する必要があるが、例えばPEOアミンを用いる場合重合度が10~500の範囲、好ましくは30~400、さらに好ましくは100~300のものが適している。親水性スパーサーを導入することにより立体障害が小さくなり、目的物質との結合性を大きく向上させることができる。さらに親水性スパーサーによる排除体



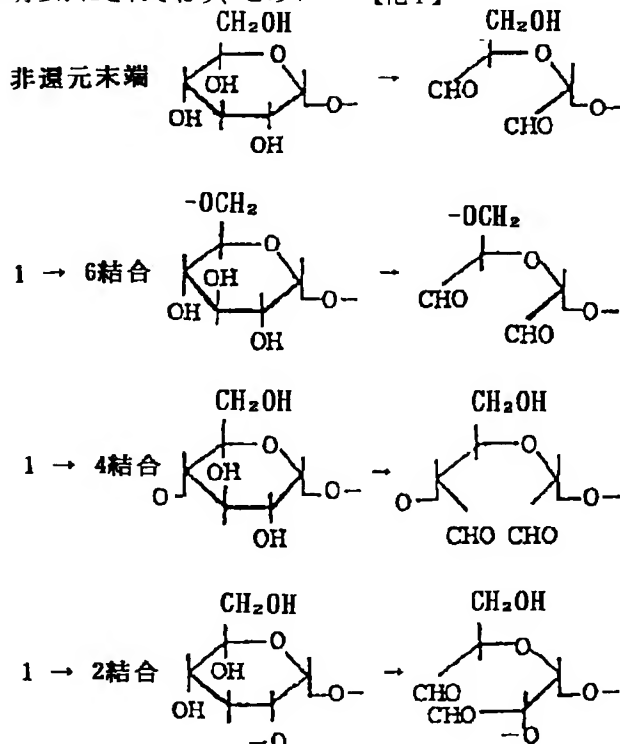
積効果および親水性の向上により、非特異的な吸着を抑えることができる。

【0019】一方リガンドであるI g Yにおける糖鎖部分へのアルデヒド基の導入は過ヨウ素酸またはその塩で酸化して、グリコール部位を開裂してアルデヒド基を形成させることにより行なうのが好ましい。I g Yにおいては哺乳類I g Gと比較してその糖鎖にグルコース残基が非常に多く存在することが明らかにされており、この\*

\* 反応の利用は有効である。過ヨウ素酸による酸化反応はグリコール部位の隣接する水酸基間で生ずるものであり、1モルの $\text{IO}^+$ が $\text{IO}^+$ に還元されことにより2モルのアルデヒド基が形成される。得られる反応物の構造はグルコシド結合の種類により異なってくるが、下記式に示すようなものが考えられる。

【0020】

【化1】



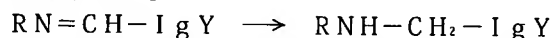
【0021】過ヨウ素酸の量はI g Yと同モル以上の過剰量を用いて反応させるのが望ましい。反応時のpH値は3～6で行なうのが好ましいが、I g Yの安定性や副反応の発生しやすさの点を考慮してpH4～5で行なうのがより好ましい。また反応液には0.1M程度の酢酸あるいはクエン酸緩衝液を用いるのが適当である。反応温度は室温あるいはそれ以下が好ましく、5℃で行なうのが最も理想的である。反応時間は室温では1時間以内で十分であるが、5℃では12～24時間程度行なう必要がある。

【0022】また酸化反応終了後にはエチレングリコール、グリセリン、亜硫酸ナトリウムなどの物質を添加して過剰の酸化剤を除去する必要がある。また酸化反応の際に用いた緩衝液を外液として、透析処理を5℃で12時間以上行なうことによりこれらの物質を除去するのがより好ましい。

【0023】こうして得たアルデヒド基の導入されたI g Yを、上記のようなPEOアミンの結合した担体と Schiff塩基を形成させて結合する。この反応は室温または5℃で10～30時間、pHは6～10の範囲で行ない

pH8～9.5の範囲で行なうのがより望ましい。反応液としては0.1M程度の炭酸緩衝液を用いるのが好ましい。

【0024】こうして得られた Schiff塩基は安定性に乏しく、特に酸性あるいはアルカリ性の条件下では分解を受けやすい。そこで次式に示すように(式中Rは担体を表わす)、還元反応を行なうことにより安定化させるのが適当である。



40 Schiff塩基の還元反応は水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaBH}_4$ )あるいはシアノ水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ )の添加により行なうのが好ましい。反応は室温または5℃において、pH8～9の炭酸緩衝液中で3～30時間行なうのが望ましい。

【0025】本発明の固定化方法において、アミノ基を表面に有する水不溶性担体に、糖鎖にアルデヒド基を導入したI g Yをリガンドとして導入するには、上記のような方法を基本とすれば特に限定されるものではないが、たとえば多孔質セルロースを担体としてPEOアミンを親水性スパーサーとして介してI g Yを導入する場

合には、以下の方法が好ましい。

【0026】(1) セルロースの改質

過ヨウ素酸ナトリウムを0.1～5.0規定、好ましくは0.5～1.5規定の硫酸に溶解した溶液に平均粒子径が20～2000 $\mu$ m、平均細孔径が200～3000 $\text{\AA}$ の粒状多孔質セルロースを添加し、10～50℃好ましくは20～30℃で、5～30時間好ましくは10～24時間反応させる。上記過ヨウ素酸ナトリウム-硫酸溶液の過ヨウ素酸ナトリウム濃度は2～15重量%好ましくは4～10重量%である。また上記粒状多孔質セルロースの過ヨウ素酸ナトリウム溶液への溶比は10～30容量%好ましくは15～25容量%である。この反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して、膨潤状態でアルデヒド含量0.10～4.00meq/g好ましくは0.20～1.00meq/gの[アルデヒド]-[セルロース]を得る。この[アルデヒド]-[セルロース]は先に示したような一部のグルコースユニットが開環した構造を有している。

【0027】(2) スペーサーの導入

重合度が10～500、好ましくは30～400、さらに好ましくは100～300のPEOアミンをpH9.5の炭酸緩衝液に溶解させる。これに上記(1)で得た[アルデヒド]-[セルロース]を添加して攪拌しながら10～50℃好ましくは20～30℃で、5～30時間好ましくは10～24時間反応させる。上記PEOアミンの濃度は0.2～5.0重量%好ましくは0.4～3.0重量%で、この溶液への[アルデヒド]-[セルロース]の溶比は3～20容量%好ましくは5～15容量%である。この反応混合物を濾過して生成物を回収、水洗して[PEOアミン]-[セルロース]を得る。

【0028】(3) IgY糖鎖の改質

ヒト低比重リボタンパク質(以下hLDLと言う)を完全アジュバントとともに免疫したレグホンの鶏卵の卵黄部分から $\lambda$ カラギーナン水溶液に混合して遠心分離して得られた上清をイオン交換クロマトグラフィおよび塩析により精製して得た抗hLDL-IgYを10～20mg、20～50mlのpH4.5の酢酸緩衝液に溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム1～5mgを添加して室温で攪拌して30分～1時間反応させる。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して5℃で5～10時間反応させ、この反応液を上記酢酸緩衝液を外液として5℃で12～24時間透析を行う。こうして[アルデヒド]-[IgY]溶液を得る。

【0029】(4) IgYの導入

上記(3)で得た[アルデヒド]-[IgY]溶液にpH9.5の炭酸緩衝液を加えてpHを8.0～9.0に調整した後に、上記(2)で得た[PEOアミン]-[セルロース]3g(膨潤状態)を添加し、5℃で20～30時間反応させてシッフ塩基を形成させる。この反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して、

膨潤状態でpH9.0の炭酸緩衝液を加え、さらに水素化ホウ素ナトリウムを0.2～1g添加して5℃で5～15時間攪拌により還元反応を行う。この反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄することにより、抗hLDL抗体をPEOアミンをスペーサーとして介してセルロースに固定化したものを得る。

【0030】

【実施例】以下実施例を用いて本発明を説明するが、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲で変更実施することは全て本発明の技術的範囲に包含される。

【0031】<実施例1> 抗hLDL-IgYの固定化

hLDL(ケミコン社製)を免疫したレグホンの卵黄から抽出および精製して得られた抗hLDL-IgYの多孔質セルロースへの固定化を次のようにして実施した。

【0032】過ヨウ素酸ナトリウム800mgを1N硫酸200mlに溶解して、多孔質セルロース(チッソ社製「セルロファインCPCm」)20gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して[アルデヒド]-[セルロース]を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.55meq/gであった。

【0033】分子量5000のPEOアミン2gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の[アルデヒド]-[セルロース]5gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して[PEOアミン]-[セルロース]を得た。アミノ基含量は平沼産業製「COMTITE101」を使用して塩酸による電位差滴定により定量を行なったところ0.20meq/gであった。

【0034】一方上記IgY40mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析処理を行ない[アルデヒド]-[IgY]溶液を得た。

【0035】上記[アルデヒド]-[IgY]液を炭酸緩衝液を添加してpHを9.0に調整し、上記[PEOアミン]-[セルロース]1gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。

【0036】IgYの固定化量はシッフ塩基反応の残液をトリクロロ酢酸溶液により沈殿させ、水酸化ナトリウム水溶液に溶解したものをBCAタンパク質定量用試薬

(ピアス社製)により残存量を定量することにより算出したところ(以下TCA-BCA法と言う)、27.9mgが固定化されていた。

【0037】上記IgYを固定化したセルロースゲル1mlをブタ血清(LDL値150.5mg/ml)2mlと20mlのバイアル中で混合して、30℃で30分間振盪することによりインキュベートした後、遠心上清のLDL値を「βリポ蛋白Cテストワーク」(和光純薬工業製)により定量した。得られた残存LDL値からLDL吸着率を算出した結果を表1に示す。

【0038】

【表1】

	LDL吸着率 (%)
実施例1	70.4
実施例2	53.4
比較例1	13.7
比較例2	21.6

【0039】<実施例2> 抗hLDL-IgYの固定化

テトラエチレンペンタミン110gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例1で調製した[アルデヒド]-[セルロース]10gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し十分に洗浄して[アミン]-[セルロース]を得た。アミノ基含量は0.27meq/gであった。

【0040】一方実施例1におけるIgY40mgをpH4.5のクエン酸緩衝液50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析処理を行ない[アルデヒド]-[IgY]溶液を得た。

【0041】上記[アルデヒド]-[IgY]液を炭酸緩衝液を添加してpHを9.0に調整し、上記[アミン]-[セルロース]5gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。IgYの固定化量はシッフ塩基反応の残液のIgY量をTCA-BCA法により定量して算出したところ、30.5mgが固定化されていた。このIgY固定化担

体について実施例1と同様にしてLDL吸着率を求めた。その結果を表1に示す。

【0042】<実施例3> 抗エンドトキシン-IgYの固定化

ウシアルブミンに結合させてハプテン化したE.coli J5由来のリピドA(リビ社製)を免疫したレグホンの卵黄から抽出および精製して得られた抗hLDL-IgYの多孔質セルロースへの固定化を次のようにして実施した。

10 【0043】過ヨウ素酸ナトリウム800mgを1N硫酸200mlに溶解して、多孔質セルロース(チッソ社製「セルロファインGCL-1000m」)20gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して[アルデヒド]-[セルロース]を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行なったところ0.43meq/gであった。

20 【0044】分子量1000のPEOアミン4gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の[アルデヒド]-[セルロース]5gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して[PEOアミン]-[セルロース]を得た。アミノ基含量は0.22meq/gであった。

【0045】一方上記IgY20mgをpH4.5のクエン酸緩衝液50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析を行ない

30 [アルデヒド]-[IgY]溶液を得た。

【0046】上記[アルデヒド]-[IgY]液を炭酸緩衝液を添加してpHを9.0に調整し、上記[PEOアミン]-[セルロース]1gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。IgYの固定化量は実施例1と同様にして算出し、17.3mgが固定化されていた。

【0047】上記IgYを固定化したセルロースを凍結乾燥した担体100mgを滅菌した20mlのバイアル中に秤量して、10ng/mlのE.coli O111:B4由来のリポポリサッカライド(以下LPSと言う、Difco社製)生理食塩水溶液5mlを加えた。37℃で2時間振盪しながらインキュベートを行なった後、その濾液中の残存LPS濃度を「トキシノメーターET201」(和光純薬工業製)により定量した。その結果を表2に示す。

【0048】

【表2】

	残存LPS濃度 (ng/nl)
実施例3	0.05
比較例3	3.22

【0049】＜実施例4＞ 抗ヒトヘモグロビン-IgYの固定化

ヒトヘモグロビン（バイオザイムラボラトリー社製）を免疫したレグホンの卵黄から抽出および精製して得られた抗ヒトヘモグロビン-IgYの多孔質セルロースへの固定化を次のようにして実施した。

【0050】過ヨウ素酸ナトリウム800mgを1N硫酸200mlに溶解して、多孔質セルロース（チッソ社製「セルロファインGCL-1000m」）20gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【アルデヒド】-【セルロース】を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.48meq/gであった。

【0051】分子量4000のPEOアミン1gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の【アルデヒド】-【セルロース】5gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアミン】-【セルロース】を得た。アミノ基含量は0.22meq/gであった。

【0052】一方上記抗体20mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析を行ない【アルデヒド】-【IgY】溶液を得た。

【0053】上記【アルデヒド】-【IgY】液に炭酸緩衝液を添加してpHを9.0に調整し、上記【PEOアミン】-【セルロース】1gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化抗体を得た。抗体の固定化量は実施例1と同様にして算出したところ、17.1mgが固定化されていた。

【0054】上記IgYを固定化したセルロース1mlを20mlのバイアル中に取り、200mg/dlのヒトヘモグロビン水溶液を加えて5時間振盪後遠心分離を行ないその上清のヒトヘモグロビン濃度をTMB（テトラメチルベンジジン）法により定量した。その結果を表

3に示す。

【0055】

【表3】

	残存ヒトヘモグロビン濃度 (mg/dl)
実施例4	7.2
比較例4	29.2

【0056】＜比較例1＞ 抗hLDL-IgYの固定化

両末端にカルボキシル基を有している分子量5000のポリ（オキシエチレン）（以下PEO酸と言う）23gをpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解して氷冷した後、1mgの1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド（以下EDCと言う）を添加して30分間攪拌した。その後実施例1において調製した【アミン】-【セルロース】5gを加えて室温で20時間攪拌して反応させた。反応物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEO酸】-【セルロース】を得た。

【0057】実施例1におけるIgY40mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解して氷冷した後、1mgのEDCを添加して30分間攪拌した。その後上記【PEO酸】-【セルロース】を加えて室温で攪拌して反応させた。反応物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。IgYの固定化量はシッフ塩基反応の残液のIgY量をTCA-BCA法により定量して算出したところ、27.7mgが固定化されていた。このIgY固定化担体について実施例1と同様にしてLDL吸着率を求めた。その結果を表1に示す。

【0058】＜比較例2＞ 抗hLDL-IgYの固定化

分子量5000のPEOアミン2gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例1における【アルデヒド】-【セルロース】5gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアミン】-【セルロース】を得た。アミノ基含量はアミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.21meq/gであった。

【0059】上記【PEOアミン】-【セルロース】をpH9.5の炭酸緩衝液50mlに懸濁して25%グルタルアルデヒド水溶液2mlを加えて室温で20時間攪拌により反応させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアルデヒド】-【セルロース】を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.38meq/gであった。

【0060】実施例1におけるIgY40mgをpH

9. 5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記〔PEOアルデヒド〕－〔セルロース〕を加え、室温で20時間攪拌により反応させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して、pH9.0の炭酸緩衝液50mlに懸濁させ、NaBH<sub>4</sub>1gを添加して室温で10時間攪拌により反応させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。IgYの固定化量はシッフ塩基反応の残液のIgY量をTCA-BCA法により定量して算出し、22.0mgが固定化されていた。このIgY固定化担体について実施例1と同様にしてLDL吸着率を求めた。その結果を表1に示す。

【0061】＜比較例3＞ 抗エンドトキシン－IgYの固定化

テトラエチレンペンタミン110gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例3で調製した〔アルデヒド〕－〔セルロース〕10gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し十分に洗浄して〔アミン〕－〔セルロース〕を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.31meq/gであった。

【0062】分子量10000のPEO酸23gをpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解して氷冷した後、1mgのEDCを添加して30分間攪拌した。その後上記〔アミン〕－〔セルロース〕5gを加えて室温で20時間攪拌して反応させた。反応物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して〔PEO酸〕－〔セルロース〕を得た。

【0063】実施例3におけるIgY40mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解して氷冷した後、1mgのEDCを添加して30分間攪拌した。その後上記〔PEO酸〕－〔セルロース〕を加えて室温で攪拌して反応させた。反応物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。IgYの固定化量はシッフ塩基反応の残液のIgY量をTCA-BCA法により定量して算出し、28.4mgが固定化されていた。このI\*

\* g Y固定化担体について実施例3と同様にしてLPS吸着量を定量した。その結果を表2に示す。

【0064】＜比較例4＞ 抗ヘモグロビン－IgYの固定化

テトラエチレンペンタミン110gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例4で調製した〔アルデヒド〕－〔セルロース〕10gを加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し十分に洗浄して〔アミン〕－〔セルロース〕を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.31meq/gであった。

【0065】分子量4000のPEO酸23gをpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解して氷冷した後、1mgのEDCを添加して30分間攪拌した。その後上記〔アミン〕－〔セルロース〕5gを加えて室温で20時間攪拌して反応させた。反応物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して〔PEO酸〕－〔セルロース〕を得た。

【0066】実施例3におけるIgY40mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に溶解して氷冷した後、1mgのEDCを添加して30分間攪拌した。その後上記〔PEO酸〕－〔セルロース〕を加えて室温で攪拌して反応させた。反応物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化IgYを得た。IgYの固定化量はシッフ塩基反応の残液のIgY量をTCA-BCA法により定量して算出し、27.2mgが固定化されていた。このIgY固定化担体について実施例4と同様にしてヒトヘモグロビン吸着量を定量した。その結果を表3に示す。

【0067】

【発明の効果】本発明により、IgYをその活性を失活させたりあるいは変性させたりすることなく水不溶性担体に固定化することが可能となり、固定化前に近い活性を維持したIgY固定化担体を提供することが可能となった。本発明は吸着材、アフィニティクロマト用担体、エンザイムイムノアッセイ、バイオセンサーなど広範囲な領域において有用なものである。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

G01N 33/544

識別記号

庁内整理番号

Z 9015-2J

F I

技術表示箇所

(72)発明者 世古 政弘

滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72)発明者 田中 昌和

滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72)発明者 金 武祚

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72)発明者 藤木 優

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内

(72)発明者 八田 一  
三重県四日市市赤堀新町 9 番 5 号 太陽化  
学株式会社内